

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 10 月 11 日 (11.10.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/114482 A1

- (51) 国際特許分類:
C08B 37/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/057614
- (22) 国際出願日: 2007 年 3 月 29 日 (29.03.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2006-092702 2006 年 3 月 30 日 (30.03.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚化学株式会社 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5400021 大阪府大阪市中央区大手通 3 丁目 2 番 2 7 号 Osaka (JP). 公立大学法人横浜市立大学 (YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 2 2 - 2 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梶原 康宏 (KAJIHARA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 2 2 - 2 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 南部 由利 (NAMBU, Yuri) [JP/JP]; 〒7710193 徳島県徳島市川内町加賀須野 4 6 3 大塚化学株式会社内 Tokushima (JP). 深江 一博 (FUKAE,

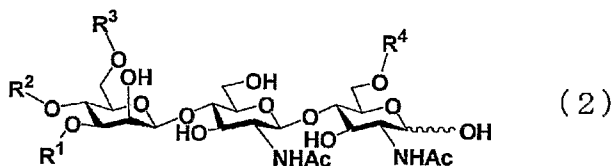
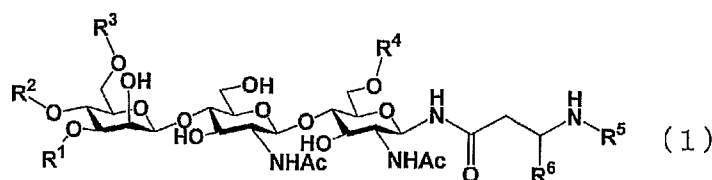
Kazuhiro) [JP/JP]; 〒7710193 徳島県徳島市川内町加賀須野 4 6 3 大塚化学株式会社内 Tokushima (JP). 朝井 洋明 (ASAI, Hiroaki) [JP/JP]; 〒7710193 徳島県徳島市川内町加賀須野 4 6 3 大塚化学株式会社内 Tokushima (JP).

- (74) 代理人: 田村 巖 (TAMURA, Iwao); 〒5610872 大阪府豊中市寺内 1 丁目 9 番 2 2 号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF SUGAR CHAIN COMPOUND

(54) 発明の名称: 糖鎖化合物の製造方法

R³, R⁴ and Ac are as defined above.]

(57) Abstract: Disclosed is a process for production of a sugar chain compound represented by the formula (2), wherein the process comprises reacting a sugar chain asparagine compound represented by the formula (1) with hydrazine hydrate. (1) [wherein R¹, R² and R³ independently represent a hydrogen atom or a sugar residue; R⁴ represents a hydrogen atom or a fucose residue; Ac represents an acetyl group; R⁵ represents a hydrogen atom, a lipid-soluble protecting group, an amino acid residue or a peptide residue; and R⁶ represents a carboxyl group or a group -COR⁷ where R⁷ represents an amino acid residue or a peptide residue.] (2) [wherein R¹, R²,

(57) 要約: 式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物にヒドラジン水和物を作用させることを特徴とする式(2)で表される糖鎖化合物の製造方法。(1)[式中、R¹、R²及びR³は同一又は異なって水素原子、糖残基を示す。R⁴は水素原子又はフコース残基を示す。Acはアセチル基を示す。R⁵は水素原子、脂溶性の保護基、アミノ酸残基、又はペプチド残基を示し、R⁶はカルボキシル基又は基-COR⁷を示す。R⁷は、アミノ酸残基又はペプチド残基を示す。](2)[式中、R¹、R²、R³、R⁴及びAcは前記に同じ。]



添付公開書類：
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

糖鎖化合物の製造方法

5 技術分野

本発明は、糖鎖アスパラギン化合物の還元末端C－N結合を切断し、還元末端に遊離水酸基を有する糖鎖化合物の製造方法に関する。

背景技術

10 糖鎖がタンパク質と共有結合した分子は糖タンパク質と呼ばれている。糖タンパク質中の糖鎖はタンパク質の3次元構造の維持や溶解性の調節、プロテアーゼ耐性の付加などの働きを担っている。最近になり、糖タンパク質中の糖鎖が受精や分化、シグナル伝達、癌化、タンパク質の細胞内輸送や生理活性の調節などの生命現象に関与することが明らかにされつつある。このように、タンパク質に結合した糖鎖は様々な生理機能に重要な役割を果たしている。しかし、これら糖鎖の構造は多様で、その種類は膨大であるため、どの構造の糖鎖が生命現象に関与しているかを特定するのはきわめて困難な状況である。こういった機能の解明のためにも、単一構造の糖鎖を持った糖タンパク質、糖ペプチドの合成が必要不可欠である。

20 糖タンパク質は糖とタンパク質との結合様式の違いから2つのグループに分けることができる。一つはアスパラギン（A s n）の側鎖のアミノ基と糖鎖が結合したアスパラギン結合型糖鎖（N－結合型）である。もう一つはセリン（S e r）やトレオニン（T h r）の水酸基に糖鎖が結合したムチン結合型糖鎖（O－結合型）である。

25 本発明者等は、鶏卵より酵素法と化学法を組み合わせることで2分岐複合型糖鎖を大量に調製する方法（特許文献1）を確立し、糖鎖還元末端に遊離水酸基を

有する複合型糖鎖からアミノ化複合型糖鎖誘導体を製造し、得られた該誘導体をペプチドのチオール基に選択的に導入できることを示した（特許文献2）。

糖鎖還元末端に遊離水酸基を有するN-結合型糖鎖の調製には、糖鎖アスパラギン及びその誘導体や糖タンパク質から酵素により糖鎖を切り出す方法や化学的に切断する方法がある。通常化学的に切断する方法としては、ヒドラジン分解法が用いられる。ヒドラジンを、ヒドラジン水和物や水の存在下で使用した場合、糖鎖還元末端側の糖が脱離（β脱離）するため、無水ヒドラジンが用いられる。

【特許文献1】WO 03/008431号公報

【特許文献2】WO 2004/011036号公報

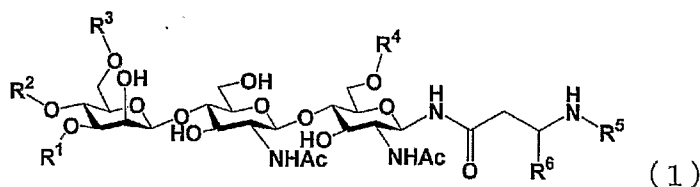
しかしながら、無水ヒドラジンはその毒性や発火性等により、操作には慎重を要し、大量の処理には不向きな試薬であるため、安全で有効なN-結合型糖鎖の切り出し方法が求められている。

本発明の目的は、無水ヒドラジンに比し、安全なヒドラジン水和物を使用して、還元末端に遊離水酸基を有するN-結合型糖鎖化合物を製造する方法を提供することにある。

発明の開示

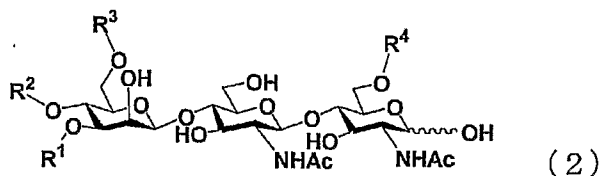
本発明は、以下の発明に係る。

式（1）で表される糖鎖アスパラギン化合物にヒドラジン水和物を作用させることを特徴とする式（2）で表される糖鎖化合物の製造方法。



[式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって水素原子、糖残基を示す。 R^4 は水素原子又はフコース残基を示す。Acはアセチル基を示す。 R^5 は水素原子、脂

溶性の保護基、アミノ酸残基、又はペプチド残基を示し、 R^6 はカルボキシル基又は基 $-COR^7$ を示す。 R^7 は、アミノ酸残基又はペプチド残基を示す。]

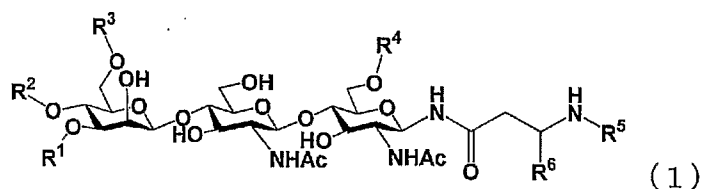


[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及びAcは前記に同じ。]

- 5 本発明者等は、これまで β 脱離を生じるために使用できなかったヒドラジン水和物を使用し、ヒドラジン分解させ、引き続きベンジルアミン化合物で置換、精製後、加水分解処理により、還元末端に遊離水酸基を有するN-結合型糖鎖化合物を製造することができることを見出した。

10 本発明の式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物は、アスパラギンに糖鎖が結合する糖タンパク質、糖ペプチド又は糖鎖アスパラギン及びそれらの誘導体等を包含する。

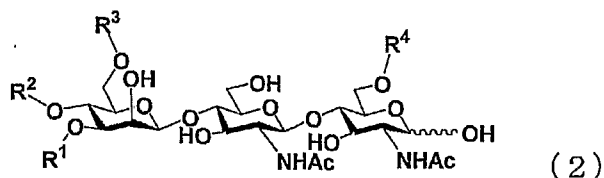
本発明の式(2)で表される糖鎖化合物は、還元末端に遊離水酸基を有するN-結合型糖鎖化合物である。



15

[式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって水素原子、糖残基を示す。 R^4 は水素原子又はフコース残基を示す。Acはアセチル基を示す。 R^5 は水素原子、脂溶性の保護基、アミノ酸残基、又はペプチド残基を示し、 R^6 はカルボキシル基又は基 $-COR^7$ を示す。 R^7 は、アミノ酸残基又はペプチド残基を示す。]

20



[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及びAcは前記に同じ。]

糖残基は、水酸基が保護されていてもよく、フッ素等のハロゲン原子で置換されていてもよいマンノース、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース等の単糖であってもよく、これら単糖の2つ以上がグリコシド結合して糖鎖を形成したものであってもよい。また、フッ素等のハロゲンが置換していてもよく、カルボキシル基が保護されていてもよいシアル酸を含んだ糖鎖であってもよい。

即ち、式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物は従来公知又は未知の糖鎖アスパラギンであってもよく、高マンノース型糖鎖アスパラギン化合物、複合型糖鎖アスパラギン化合物、混成型糖鎖アスパラギン化合物であってもよい。また、式(2)で表される糖鎖化合物は従来公知又は未知の糖鎖化合物であってもよく、高マンノース型糖鎖化合物、複合型糖鎖化合物、混成型糖鎖化合物であってもよい。

脂溶性の保護基とは、特に制限されるものではなく、例えば9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基やt-ブチルオキシカルボニル(Boc)基、アリルオキシカーボネート(Alloc)基等のカーボネート含有基、アセチル(Ac)基等のアシル基、アリル基、ベンジル基等の保護基等を挙げることができる。また、当該保護基の導入は、例えばProtecting groups in Organic chemistry (John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6)等の公知の方法に従って行えばよい。

R^5 におけるアミノ酸残基又はペプチド残基は、アスパラギンのアミノ基とカルボキシル基がアミド結合したアミノ酸又はペプチドであり、特に制限されない。

R^7 におけるアミノ酸残基又はペプチド残基は、アスパラギンのカルボキシル基とアミノ基がアミド結合したアミノ酸又はペプチドであり、特に制限されない。

本工程で使用するヒドラジン水和物は従来公知のものであれば使用でき、ヒドラジン一水和物をそのまま、又は水で希釈して使用することができ、ヒドラジン一水和物の濃度としては20～100重量%、特に好ましくは40～100重量%程度とすればよい。

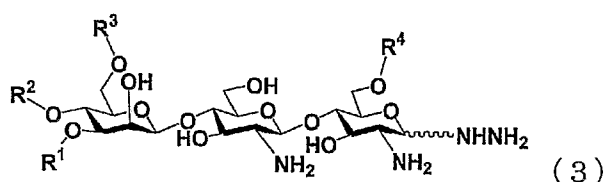
- 5 ヒドラジン水和物の使用量としては、特に制限されず、式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物1当量に対して0.8当量以上、好ましくは1.0当量以上であるが、通常溶媒をかねて使用するため大過剰量を使用するのがよく、式

(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物1重量部に対して1～10000重量部、好ましくは100～5000重量部とするのが好ましい。

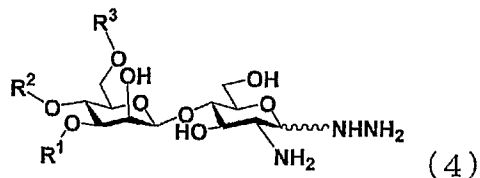
- 10 本工程の反応は加熱下で行い還流温度で行なう。本反応は式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物がヒドラジンと反応して、式(3)で表されるヒドラジノ化合物を形成すると考えられる。本発明者等の検討によれば、理由は定かではないが、β脱離反応が、式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物の大部分又は全てが式(3)で表されるヒドラジノ糖鎖化合物に変換された後に生じること
- 15 を見出した。換言すれば、式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物の大部分又は全てが式(3)で表されるヒドラジノ糖鎖化合物に変換されるまではβ脱離反応が生じないことになる。

よって本反応は式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物が全て消費されるまで行なうとしてもよいが、消費する手前で反応を終了させるのが好ましい。又はβ脱離反応によって生じる式(4)で表されるヒドラジノ糖鎖化合物の生成が生じる前に反応を終了させることが好ましい。反応は薄層クロマトグラフィー

- 20 (TLC)若しくはマススペクトルで追跡して行なうのが好ましい。反応の終了は加熱還流を中止することで行なうことができる。



[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は前記に同じ。]



[式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は前記に同じ。]

本工程の反応においては、式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物にアセチル基のようなアミド結合型保護基があるため、過剰のヒドラジンによって当該保護基が脱離してアミノ基になる。そのため、アセチル化剤を作用させてN-アセチル化する必要がある。

アセチル化剤としては、N-アセチル化反応に使用し得る従来公知アセチル化剤を使用することができ、例えば、アセチルクロライド、アセチルブロマイド等のアセチルハライドや無水酢酸を例示することができ、無水酢酸が好適に使用できる。アセチル化剤の使用量は、アミノ基1当量に対して1～20当量、好ましくは1.5～10当量程度とすればよい。

アセチル化剤を使用するN-アセチル化反応は、従来公知の方法を適用でき、例えば前記反応液を減圧下で過剰のヒドラジンを留去後、塩基の存在下、アセチル化剤を作用させることで成される。

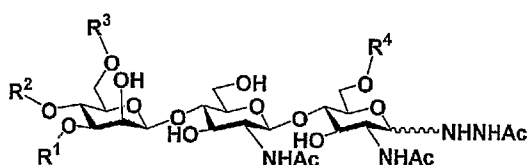
塩基としては、従来公知のものを使用でき、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム等のアルカリ金属炭酸塩、トリエチルアミン、ピリジン等の有機塩基等が挙げられるが、炭酸水素ナトリウムやピリジンが特に好ましい。塩基の使用量としては、特に制限されずアセチル化剤に対して等量又はそれ以上使用することができるが、大過剰使用するのが好ましく、例えば炭酸水素ナトリウム等のアルカリ金属炭酸塩の場合は飽和水溶液として、アセチル化剤1重量部に対して1～100重量部使用することができる。

本反応は溶媒中に行なわれ、溶媒としては、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)等を挙げることができ、これらを単独又は2種以上を混合して使用してもよ

く、水が好ましく使用できる。溶媒の使用量としては特に制限されないが、式
(3) で表される糖鎖化合物 1 重量部に対して、通常 10～2000 重量部程度、
好ましくは 100～1000 重量部程度とすればよい。

反応は -10～100℃、好ましくは 0～50℃ で行なわれ、通常 0.1～2
5 4 時間程度で完了するが、TLC やマススペクトル等で反応の進行を確認して行
なうのが好ましい。

上記アセチル化反応後の化合物は下記式 (5) で表される。



(5)

[R¹～R⁴及びAcは上記に同じ。]

10 以上のようにして得られた式 (5) で表されるヒドラジノ糖鎖化合物を含む生
成物をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで処理ことによってアスパラギン残基
等の切断片やβ脱離した糖残基を除去することができる。

得られた式 (5) で表されるヒドラジノ糖鎖化合物を酸により処理すること
によって式 (1) で表される糖鎖化合物を含む生成物が得られる。

15 使用する酸としては、塩酸、硫酸、リン酸等の鉱酸類、蟻酸、酢酸、トリフル
オロ酢酸等のカルボン酸類、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸等のスルホン
酸類を挙げることができ、中でも酢酸が安全性や使用簡便性の観点から好ましい。

酸の使用量としては、式 (5) で表されるヒドラジノ糖鎖化合物 1 当量に対し
て、1 当量以上であれば特に制限されず、1～5 当量が好ましい。通常は式

20 (5) の化合物の水溶液が十分に酸性を示す程度に酸を加えるのが好ましい。

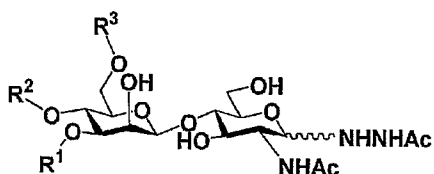
反応は 0～50℃程度、好ましくは 10～40℃程度とすればよく、通常 1～
15 時間程度、好ましくは 2～10 時間程度で完結するが、TLC やマススペク
トルで反応を追跡して、終了を確認するのが好ましい。

5 以上のようにして式（２）で表される糖鎖化合物を含む生成物を製造することができるが、上記のヒドラジン分解においては、 β 脱離が生じない段階で反応を終了させた場合には原料となる式（１）で表される糖鎖アスパラギン化合物が残存することになり、反応がやや進行した場合には β 脱離した式（４）で表される

ヒドラジノ糖鎖化合物のN-アセチル体（６）が混入することになる。また、式（３）で表されるヒドラジノ糖鎖は不安定で時間経過とともに β 脱離を生じる。

よって、この段階で得られる式（２）で表される糖鎖化合物には、化合物（１）、（４）、（６）等の他の化合物の混入が認められる。

上記式（６）の化合物は下記に示される。



（６）

[R¹～R³及びAcは上記に同じ。]

次に上記で得られた式（２）で表される糖鎖化合物及び他の化合物の混合物に溶媒中、アミン化合物を作用させる。

アミン化合物としては、例えば、メチルアミン、エチルアミン、イソプロピルアミン等の炭素数１～４のモノアルキルアミン、シクロプロピルアミン、シクロブチルアミン、シクロペンチルアミン、シクロヘキシルアミン、シクロヘプチルアミン、シクロオクチルアミン等の炭素数３～８のシクロアルキルアミン、置換基を有することのあるベンジルアミン類を挙げることができる。置換基を有することのあるベンジルアミンの置換基としては、フッ素、塩素、臭素等のハロゲン

15 原子、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基等の炭素数１～４のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、tert-ブトキシ基等のアルコキシ基、ニトロ基等を挙げることができ、これらの置換基が単独又はフェニル環上の任意の位置に、２～５個が同一又は異なって置換しているものを包含する。これらのベンジルアミン類の中

でもベンジルアミン、p-メトキシベンジルアミン、2, 4, 5-トリメトキシベンジルを好ましく例示でき、中でもp-メトキシベンジルアミンが特に好ましい。

アミン化合物の使用量としては、式(2)で表される糖鎖化合物1当量に対して、通常1～20当量、好ましくは2～10当量とすればよい。

5 本反応は、樟脳スルホン酸等の酸の存在下で行なうのが好ましい。

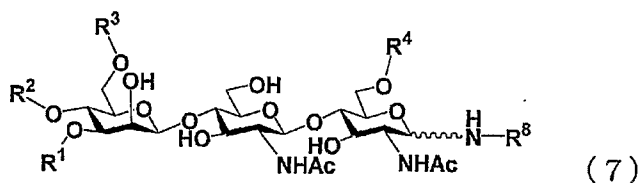
酸の使用量としては、式(1)で表される糖鎖化合物1当量に対して0.01～5当量、好ましくは0.05～1当量とすればよい。

本反応において使用する溶媒としては、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)等を挙げることができ、これらを単独又は2種以上を混合して使用してもよい。

溶媒の使用量としては特に制限されないが、式(2)で表される糖鎖化合物1重量部に対して、通常10～2000重量部程度、好ましくは100～1000重量部程度とすればよい。

15 本反応は、通常0～100℃、好ましくは10～50℃程度で行なえばよく、通常1～24時間程度で完結するが、TLC又はマススペクトル等で反応を追跡し、原料が消失する時点で反応を終了させればよい。

本反応により、糖鎖還元末端にアミノ化合物が置換した式(7)で表されるアミノ糖鎖化合物を得ることができ、本化合物は塩基に対しても安定で、β脱離反応を生じず、糖鎖構造を維持することができる。なお、本反応の原料中に混入した式(6)で表されるヒドラジノ糖鎖化合物も同様に反応して、相当するアミノ置換化合物を与える。



[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及びAcは前記に同じ。 R^8 は炭素数1～4のアルキル基、炭素数3～8のシクロアルキル基、置換基を有することのあるベンジル基を示す。]

ここで、 R^8 の炭素数1～4のアルキル基としては、メチル基、エチル基、イ
5 ソプロピル基等を挙げることができ、炭素数3～8のシクロアルキル基としては、
シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シ
クロヘプチル基、シクロオクチル基等を挙げることができる。置換基を有するこ
とのあるベンジル基の置換基としては、フッ素、塩素、臭素等のハロゲン原子、
メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基等の炭
10 素数1～4のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポ
キシ基、tert-ブトキシ基等のアルコキシ基、ニトロ基等を挙げることがで
き、これらの置換基が単独又はフェニル環上の任意の位置に、2～5個が同一又
は異なって置換しているものを包含する。これらのベンジル基の中でもベンジル
基、p-メトキシベンジル基、2, 4, 5-トリメトキシ基を好ましく例示でき、
15 中でもp-メトキシベンジル基が特に好ましい。

得られた式(7)で表されるアミノ糖鎖化合物及びその他の化合物をカラムク
ロマトグラフィーで処理することによって、式(7)で表されるアミノ糖鎖化合
物を単離精製することができる。

クロマトグラフィーでの分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独で又
20 は複数組み合わせるにより行なうことができ、例えばゲルろ過クロマ
トグラフィーで精製後、逆相系のカラムクロマトグラフィーを用いて精製するこ
とができる。

逆相系のカラムとしては、例えば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、
陰イオン交換系のカラム等を挙げることができるが、式(7)で表されるアミノ
25 糖鎖化合物のアミノ基部がODSカラムのオクタデシル基と強い相互作用を生み、
分離能に優れる。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。

得られる式(7)で表されるアミノ糖鎖化合物は新規化合物である。

上記クロマトグラフィーにより単離した式（７）で表されるアミノ糖鎖化合物に酸を作用させることで目的の式（２）で表される糖鎖化合物とすることができる。

使用する酸としては、塩酸、硫酸、リン酸等の鉱酸類、蟻酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等のカルボン酸類を挙げることができ、カルボン酸類が好ましく、中でも酢酸が使用上安全且つ簡便で好ましい。

酸の使用量としては、式（７）で表されるアミノ糖鎖化合物１当量に対して、１当量以上であれば特に制限されず、１～５当量が好ましい。通常は式（７）の化合物の水溶液が十分に酸性を示す程度に酸を加えるのが好ましい。

反応は０～５０℃程度、好ましくは１０～４０℃程度とすればよく、通常１～１５時間程度、好ましくは２～１０時間程度で完結するが、ＴＬＣやマススペクトルで反応を追跡して、終了を確認するのが好ましい。

得られた式（２）で表される糖鎖化合物は、クロマトグラフィー等で精製することができる。

15

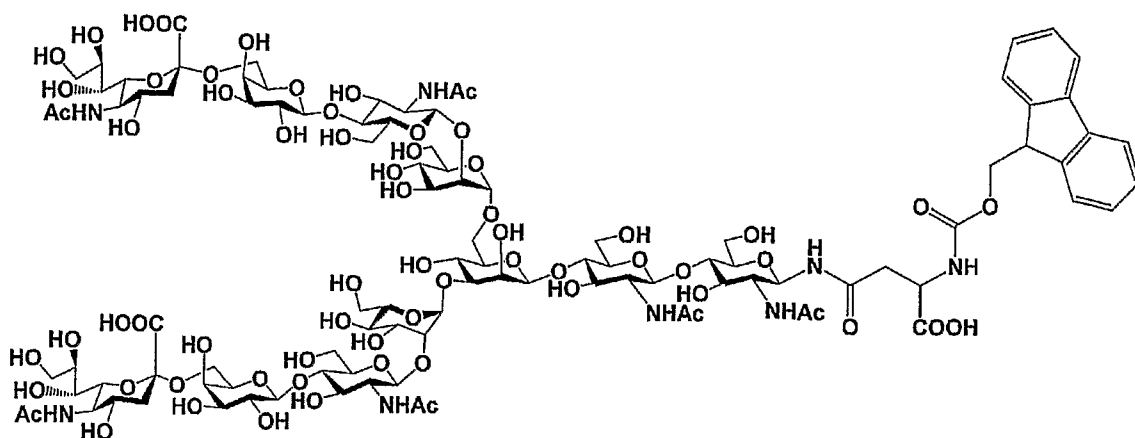
発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

糖鎖アスパラギン化合物（１－１）１０ｍｇにヒドラジン水和物（ヒドラジン５５％）１０ｍｌを加えて室温で溶解させた。これを１００℃で加熱還流させた。ＴＬＣ（イソプロパノール：１Ｍ酢酸アンモニウム水溶液＝１：１）で反応を追跡し、ＴＬＣ上で原料が消失した時点で加熱還流を止めた。なお、糖鎖アスパラギン化合物（１－１）においてヒドラジン水和物添加直後にＦｍｏｃ基が脱離するので、Ｆｍｏｃ基が脱離した糖鎖アスパラギン化合物を原料として扱った。

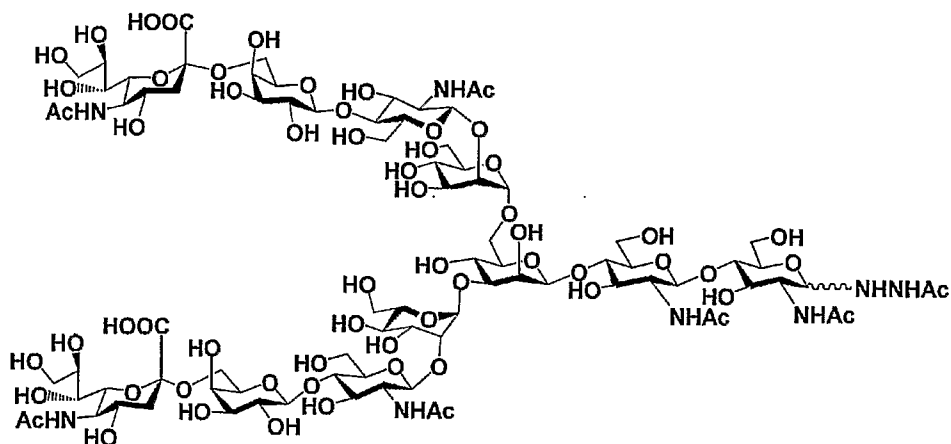
25



(1-1)

反応液を減圧下で乾固するまで濃縮し、得られた残渣に水 1 m l を加えて溶かした。この水溶液に炭酸水素ナトリウム粉末を飽和するまで加えた後、無水酢酸 (0.1 mL) を加えた。反応を T L C (イソプロパノール : 1 M 酢酸アンモニウム水溶液 = 1.5 : 1) でアセチル化の進行を追跡した。また T L C (イソプロパノール : 1 M 酢酸アンモニウム水溶液 = 1 : 1) で原料の消失を確認して、炭酸水素ナトリウム粉末を反応液の p H が 7 ~ 8 になるように加えて中和した。

反応液を減圧下で乾固するまで濃縮し、得られた残渣を水 1 m l に溶かし、ゲルろ過クロマトグラフィー (カラム担体 : S e p h a d e x G - 2 5、カラムサイズ : ϕ 16 mm $\times$ 345 mm、流速 : 0.8 mL / m i n、展開溶媒 : 水) で化合物 (5-1) を含むフラクションを分取し、減圧下濃縮した。



(5-1)

得られた濃縮残渣の5mgを水1mlに溶かし、酢酸572 μ lを加えて酢酸水溶液とした。室温で攪拌し、反応をTLC（イソプロパノール：1M酢酸アンモニウム水溶液＝1.5：1）で追跡した。6.5時間後、反応終了を確認し、1M水酸化ナトリウム水溶液で中和し、凍結乾燥して粉体とした。

- 5 得られた粉体をゲルろ過カラムクロマトグラフィー（前記条件と同じ。）で精製し、目的とする化合物（2-1）を含むフラクションを分取し、減圧下濃縮して化合物（2-1）を得た。ただし、未反応原料由来の化合物（1-2）及び β 脱離した化合物（8）の混入を認めた。

収量：8.9mg〔化合物（2-1）：化合物（2-2）：化合物（8）＝9

10 0：8：2〕

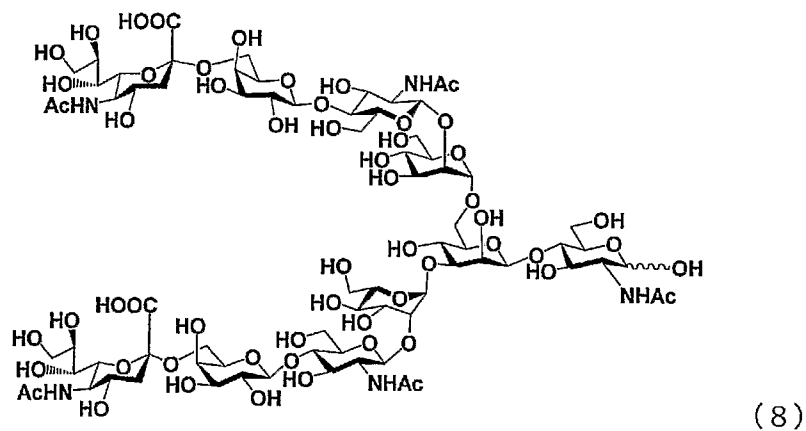
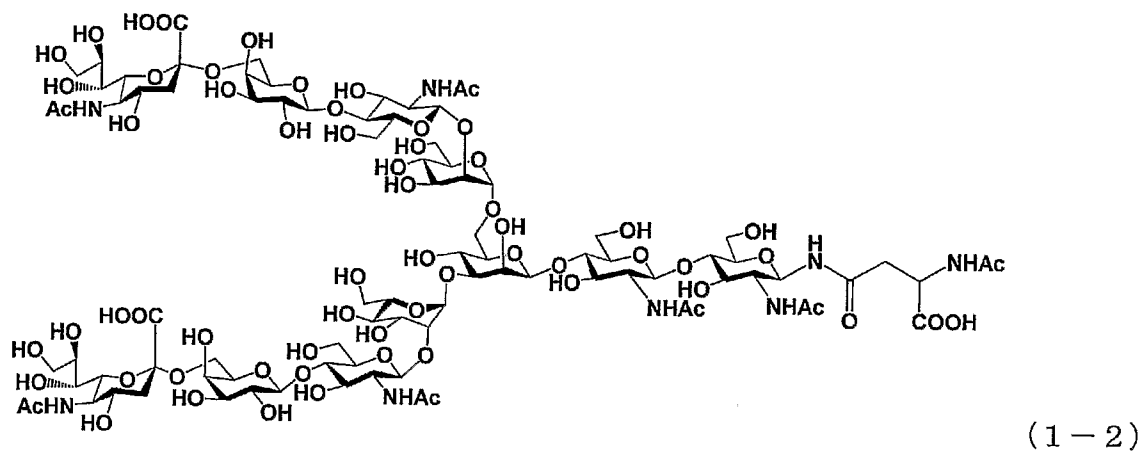
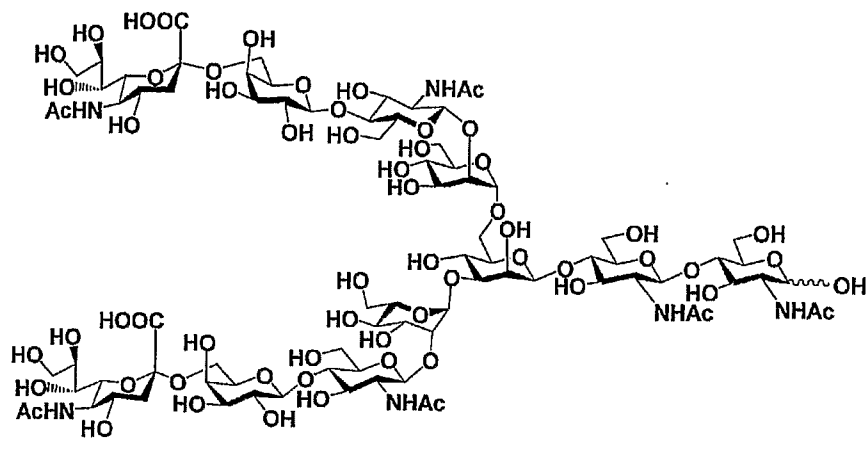
化合物（2-1）

$^1\text{H-NMR}$ （400MHz，295K，HOD＝4.81），5.28（bd，1H，GlcNAc1-H-1），5.23（s，1H，Man4-H-1），5.03（s，1H，Man4'-H-1），4.86（s，1H，Man3-H-1），4.70（m，3H，GlcNAc2，5，5'-H-1），4.53（d，2H，Gal6，6'-H-1），4.34（bs，1H，Man3-H-2），4.28（bd，1H，Man4-H-2），4.20（bd，1H，Man4'-H-2），2.76（bdd，2H，NeuAc7，7'-H-3eq），2.17（s，3H，Ac），2.16（s，6H，Ac $\times$ 2），2.13（s，6H，Ac $\times$ 3），1.80（dd，2H，NeuAc7，7'-H-3ax）。

Mass：ESI calcd for 2222，found；1110
〔(M-2) $^{-2}$ 〕

化合物（8）

25 Mass calcd for 2019，found；1008.3
〔(M-2) $^{-2}$ 〕



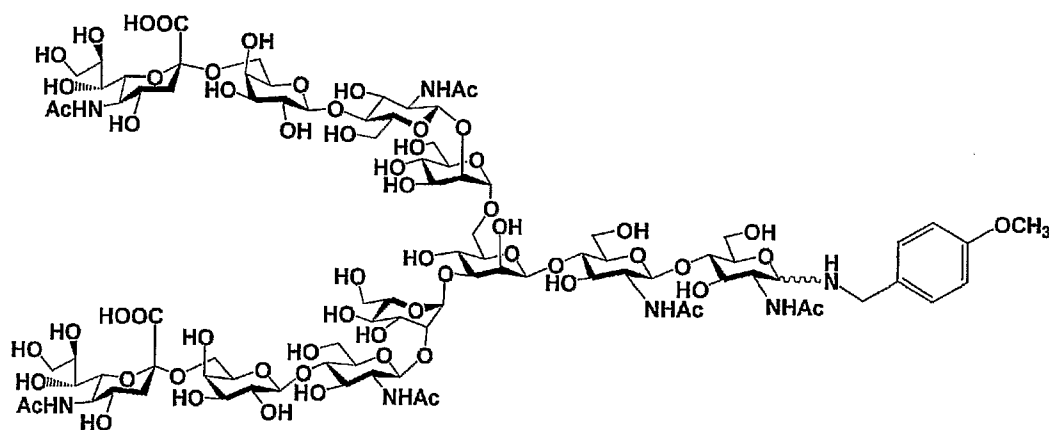
5

実施例 2

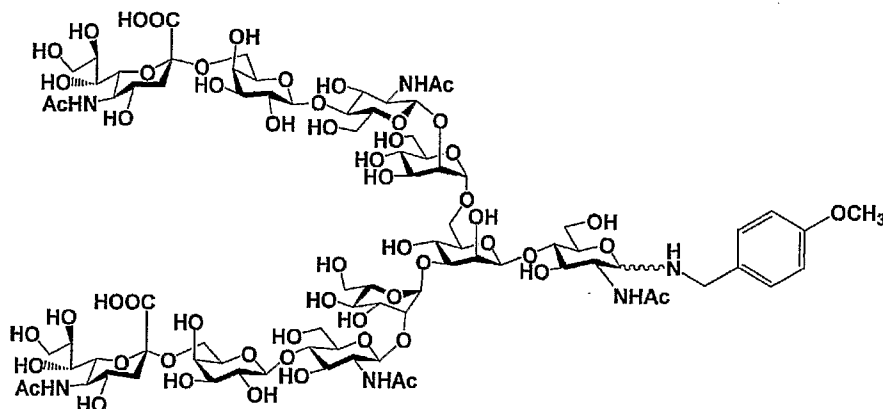
実施例 1 と同様にして得た化合物 (2-1)、化合物 (1-2) 及び化合物 (8) の混合物 45 mg を DMSO 3 ml に溶解させた。この溶液に p-メトキ

シベンジルアミン 2 m l と樟脳スルホン酸 5 m g を加え、恒温層で約 3 7 ℃ に維持して反応させた。

反応をマスペクトル (1 1 1 0 / - 2 ピークの消滅と 1 1 7 0 / - 2 ピークの生成) で追跡し、反応終了を確認した。反応液に 1 0 m M アンモニア水を加えて 2 倍に希釈し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー (カラム担体: S e p h a d e x G - 2 5、カラムサイズ: ϕ 1 0 m m $\times$ 9 0 0 m m、流速: 0. 8 m l / m i n、展開溶媒: 5 0 m M 炭酸アンモニウム水溶液又はアンモニア水 (p H 9 ~ 1 0)) で精製し、化合物 (7 - 1) を含有するフラクションを分取し、減圧下濃縮し、凍結乾燥して化合物 (7 - 1) の粉末を得た。ただし、化合物 (1 - 2) 及び化合物 (9) の混入を認めた。



(7-1)



(9)

得られた粉末 20 mg を 10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液に溶かし、10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液で完全に置換した ODS カラム（カラム担体：Cosmosil 75 C₁₈-OPN（ナカライテスク株式会社製）、カラムサイズ：0.75 × 0.75 × 10 cm）に充填した。その後、10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液を担体の 5 倍量流し、化合物（1-2）を流出させた。その後、10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液：アセトニトリル（=98：2）を担体の 5 倍量流し、担体を洗浄後、10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液：アセトニトリル（=96：4）を流して、化合物（9）の流出後、化合物（7-1）を分取した。収量：9 mg

10 化合物（7-1）

¹H-NMR（400 MHz, HOD=4.81）, δ 5.11（s, 1H, Man4-H-1）, 4.93（s, 1H, Man4'-H-1）, 4.75（s, 1H, Man3-H-1）, 4.59（m, 3H, GlcNAc2, 5,5'-H-1）, 4.43（d, 2H, Gal6, 6'-H-1）, 4.24（bs, 1H, Man3-H-2）, 4.18（bd, 1H, Man4-H-2）, 4.10（bd, 1H, Man4'-H-2）, 2.65（bdd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3eq）, 1.71（dd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3ax）.

Mass: ESI calcd for 2341.8, found;
20 1169.9 [(M-2)⁻²]

化合物（9）

Mass: ESI calcd for 2139.8, found;
1068.4 [(M-2)⁻²]

実施例 3

25 実施例 2 により得られた化合物（7-1）3 mg に水 1 ml を加えて水溶液（pH 10）とした後、酢酸約 20 μl を加えた。この時の pH は約 4 であった。

反応をマススペクトル（1170／－2ピークの消滅と1110／－2ピークの生成）で追跡し、反応終了を確認した。反応液に水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH5～6に調整し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー（カラム担体：Sephadex G-25、カラムサイズ：φ10mm×900mm、流速：0.8ml/min、展開溶媒：水）で精製し、得られたフラクションを減圧下濃縮して純度（98％）の化合物（2-1）を2.5mg得た。

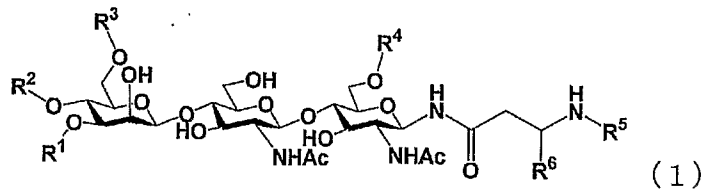
得られた化合物（2-1）のNMR及びマススペクトルデータは、前記実施例1で得られたものと同一であった。

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、ヒドラジン分解反応に安全なヒドラジン水和物を使用して、還元末端に遊離水酸基を有するN-結合型糖鎖化合物を製造することができる。

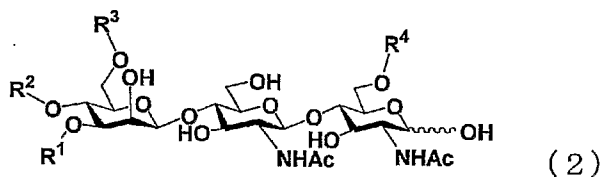
請求の範囲

1. 式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物にヒドラジン水和物を作用させることを特徴とする式(2)で表される糖鎖化合物の製造方法。



5

[式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって水素原子、糖残基を示す。 R^4 は水素原子又はフコース残基を示す。Acはアセチル基を示す。 R^5 は水素原子、脂溶性の保護基、アミノ酸残基、又はペプチド残基を示し、 R^6 はカルボキシル基又は基 $-COR^7$ を示す。 R^7 は、アミノ酸残基又はペプチド残基を示す。]



10

[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及びAcは前記に同じ。]

2. 糖鎖還元末端側のN-アセチルグルコサミンが β 脱離する前にヒドラジン水和物の作用を終了させることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

15

3. (A) 式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物にヒドラジン水和物を作用させる工程、

(B) アセチル化剤を作用させる工程、

(C) 酸を作用させる工程、

(D) 炭素数1~4のモノアルキルアミン、炭素数3~8のシクロアルキルアミ

ン及び置換基を有することのあるベンジルアミンから選ばれる少なくとも1種のアミン化合物を作用させる工程、

20

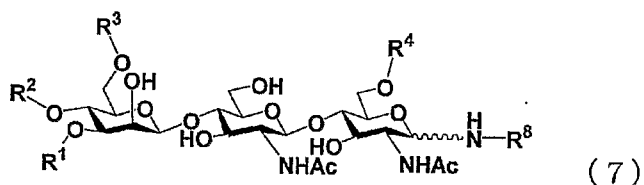
(E) カラムクロマトグラフィーで精製する工程、
 (F) 酸を作用させる工程、
 をこの順序で実施することを特徴とする式 (2) で表される糖鎖化合物の製造方法。

5 4. (A) のヒドラジン水和物の作用を、糖鎖還元末端側の N-アセチルグルコサミンが β 脱離する前に終了させる請求項 3 記載の製造方法。

5. (D) のアミン化合物が、p-メトキシベンジルアミンである請求項 3 記載の製造方法。

6. (C) 及び (F) の酸が酢酸である請求項 3 記載の製造方法。

10 7. 式 (7) で表されるアミノ糖鎖化合物。



[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び Ac は前記に同じ。 R^8 は炭素数 1～4 のアルキル基、炭素数 3～8 のシクロアルキル基、置換基を有することのあるベンジル基を示す。]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B37/08(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08B37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN) , REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2003/008431 A1 (Otsuka Chemical Co., Ltd.), 30 January, 2003 (30.01.03), Page 31, 6th line from the bottom to page 32, line 2; Fig. 12 & JP 2003-128703 A & EP 1405858 A1 & KR 2004/026667 A & US 2004/181054 A1	1-2 3-6
Y A	WO 2004/058984 A1 (Otsuka Chemical Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), Page 19, lines 31 to 41 & EP 1577397 A1 & JP 2005-509744 A & CN 1714155 A & KR 2005/085242 A & US 2006/228784 A1	1-2 3-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April, 2007 (19.04.07)

Date of mailing of the international search report

01 May, 2007 (01.05.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057614

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2004-131424 A (Nippon Soda Co., Ltd.), 30 April, 2004 (30.04.04), Par. No. [0014] (Family: none)	1-2 3-6
X	WO 2004/060915 A2 (Sloan-Kettering Institute for Cancer Research), 22 July, 2004 (22.07.04), Par. Nos. [0084] to [0087], [0090] & EP 1570056 A2 & US 2006/223744 A1	7
X	Hsing Ling Cheng et al, Determination of Linkages of Linear and Branched Oligosaccharides Using Closed-Ring Chromophore Labeling and Negative Ion Trap Mass Spectrometry, American Society for Mass Spectrometry, 2002, Vol.13, pp.1322-1330	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057614

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of claim 1 relates to a process for production of a sugar chain compound of the formula (2), wherein the process is characterized by reacting a sugar chain asparagine compound of the formula (1) with hydrazine hydrate. The invention of claim 7 relates to an amino sugar chain compound of the formula (7). However, the amino sugar chain compound of the formula (7) is already disclosed in a document (WO 2004/060915 A), and therefore cannot be regarded as a technical feature which makes contribution over the prior art.

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057614

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Further, the amino sugar chain compound of the formula (7) is different in chemical structure from the sugar chain asparagine compound of the formula (1) or the sugar chain compound of the formula (2), and therefore it has not been recognized by those skilled in the art that these compounds are closely related to each other.

Consequently, it cannot be considered that the group of inventions are so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C08B37/08 (2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C08B37/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2007年
日本国実用新案登録公報	1996-2007年
日本国登録実用新案公報	1994-2007年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	WO 2003/008431 A1（大塚化学株式会社） 2003.01.30、31頁下から6行～32頁2行、第12図 & JP 2003-128703 A & EP 1405858 A1 & KR 2004/026667 A & US 2004/181054 A1	1-2 3-6
Y A	WO 2004/058984 A1（大塚化学株式会社） 2004.07.15、19頁31～41行	1-2 3-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.04.2007

国際調査報告の発送日

01.05.2007

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

原田 隆興

4C

9167

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& EP 1 5 7 7 3 9 7 A 1 & JP 2 0 0 5 - 5 0 9 7 4 4 A & CN 1 7 1 4 1 5 5 A & KR 2 0 0 5 / 0 8 5 2 4 2 A & US 2 0 0 6 / 2 2 8 7 8 4 A 1	
Y	JP 2 0 0 4 - 1 3 1 4 2 4 A (日本曹達株式会社)	1 - 2
A	2 0 0 4 . 0 4 . 3 0、段落 0 0 1 4 (ファミリーなし)	3 - 6
X	WO 2 0 0 4 / 0 6 0 9 1 5 A 2 (Sloan-Kettering Institute for Cancer Research) 2 0 0 4 . 0 7 . 2 2 段落 0 0 8 4 ~ 0 0 8 7、段落 0 0 9 0 & EP 1 5 7 0 0 5 6 A 2 & US 2 0 0 6 / 2 2 3 7 4 4 A 1	7
X	Hsing Ling Cheng et al, Determination of Linkages of Linear and Branched Oligosaccharides Using Closed-Ring Chromophore Labeling and Negative Ion Trap Mass Spectrometry, American Society for Mass Spectrometry, 2002, Vol.13, pp.1322-1330	7

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1は、式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物にヒドラジン水和物を作用させることを特徴とする式(2)で表される糖鎖化合物の製造方法に係る発明、請求の範囲7は、式(7)で表されるアミノ糖鎖化合物に係る発明であるが、式(7)で表されるアミノ糖鎖化合物は、文献(WO 2004/060915 A)にも記載されているとおり、先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることはできない。

また、式(1)で表される糖鎖アスパラギン化合物又は式(2)で表される糖鎖化合物に対して、式(7)で表されるアミノ糖鎖化合物は、化学構造が相違し密接な関連性があるものとして当業者に認識されていたものでもない。

したがって、これらの一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。